SZENT ISTVÁN EGYETEM

Irányított DNS Transzpozíció Humán Sejtekben

Doktori értekezés tézisei

Dr. Ivics Zoltán

Gödöllô

2008

A doktori iskola

megnevezése: Biológia Tudományi Doktori Iskola

tudományága: molekuláris biológia

vezetôje: **Dr. Tuba Zoltán**
egyetemi tanár, tanszékvezetô, az MTA doktora
SZIE, Mezôgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezetô: **Dr. Burgyán József**
Az MTA doktora
Mezôgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont/Gödöllô
Növény Virológiai Csoport

....

Az iskolavezetô jóváhagyása A témavezetô jóváhagyása

Elôzmények, kitûzött célok

A DNS transzpozonok hasznos génátviteli vektorok gerinctelen modellekben, és újabban gerincesekben is. A *Sleeping Beauty* (SB, magyarul *Csipkerózsika*) transzpozon a funkcionális genomika értékes eszköze több gerinces modell szervezetben, és ígéretes a humán génterápiás alkalmazások területén is. SB egy nem vírusalapú vektor-rendszer, amely stabil kromoszómális integrációt és hosszútávú génexpressziót képes biztosítani *in vivo*. A vírusalapú génbeviteli eljárásokkal összahasonlításban elmondható, hogy alkalmazása biztonságosabb. SB egy olyan két-komponensû génvektor rendszer, amely tartalmazza a bejuttatandó gént a transzpozon inverted repeat-jei (IR, magyarul fordított szekvencia-ismétlôdések) között valamint a transzpozáz fehérjét.

A retrovírusok és a legtöbb transzpozon esetében a kromoszómális integrációs helyeket maga a transzpozáz, ill. retrovírusoknal az integráz (IN) határozza meg, melyek katalitikus domainje kontaktusba lép a cél DNS-sel. A retrovírusok esetében az integrációs célhelyek manipulációját fôként olyan módon közelítették meg, hogy az IN-t fuzionáltatták egy specifikus DNS-kötô fehérjével, pl. a λ bakteriofág represszorral vagy az *E. coli* LexA fehérjével. Bár ezek a fúziós fehérjék megváltozott inszerciós mintázatot mutattak *in vitro* körülmények között, sejtekre való adaptálásuk komoly nehézségekbe ütközött. Sem a LexA operátor sem a λ operátor szekvenciák nem fordulnak elô humán DNS-ben (tehát bármely technológia, amely célzottan ezekbe a szekvenciákba irányitja a transzgén integrálódását, fiziológiás körülmények között irreleváns). A szintetikus cink finger (CF) fehérjék a DNS-kötô fehérjék egy olyan családját alkotják, amelyek nem csak specificitással, hanem flexibilitással is rendelkeznek. Az HIV-1 IN és E2C (egy szintetikus CF, amely a humán *erb-B2* gén promoter régiójában található egyedi, 18 bázispáros szekvenciához kötôdik) alkotta fúziós fehérje sikeresen

irányított retrovirális integrációs eseményeket E2C-kötô hely közelébe *in vitro*. A Ty5 élesztô retrotranszpozon sikeres célzott inszerciója pedig egy alternatív stratégia lehetôségét vetítette elôre, amelyben az IN/transzpozáz fehérjéket olyan peptid motívumokkal módosítjuk, melyek kölcsönhatásba lépnek kromoszómális célhelyekhez kötôdô fehérjékkel.

Kísérleteink célja az SB transzpozon kromoszómális inszercióját befolyásoló tényezôk feltérképezése volt, különös tekintettel a kromoszómális megoszlásra és a fogadó DNS azon fizikai paramétereire, melyek hozzájárulnak az inszerciós célhelyek kiválasztásához a transzpozíció során. Ezen túlmenôen, a kísérletek lényeges célkitûzése volt olyan molekuláris stratégiák kidolgozása, amelyek alkalmasak lehetnek arra, hogy az SB transzpozont a humán genom elôre meghatározott célhelyeire irányítsuk. Miután a transzpozon rendszer két fô funkcionális komponensbôl áll (a transzpozon DNS-bôl és a transzpozáz fehérjébôl), a transzpozíciós komplex cél DNS-hez való irányítása elvben bármelyik komponenssel való kölcsönhatáson alapulhat. Ennek megfelelôen három különbözô stratégiát értékeltünk; mindhárom azon alapul, hogy specifikus DNS-fehérje kölcsönhatások révén a transzpozíciós komplexet egy adott kromoszómális régióba irányítjuk.

Anyag és módszer

Plazmid DNS manipulációk, PCR és elektroforetikus mobility shift assay. A restrikciós emésztések, klónozási lépések, plazmid DNS tisztítás, PCR reakciók és *in vitro* DNS kötési kísérletek (EMSA) standard molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával történtek.

Szövettenyészet és transzfekció. A humán HeLa sejteket 10% fetal bovine szérummal kiegészített DMEM médiumban tartottuk. A transzpozíciós assay során 10^5 sejtet transzfektáltunk Fugene6 transfekciós reagenst (Roche) használva 90 ng transzpozon donor plazmiddal, 90 ng transzpozáz expressziós plazmiddal és 90 ng irányító fúziós fehérjét expresszáló plazmiddal. A doxyciklin szelekció a gyártó (Clontech) javaslata alapján az 1 μg/ml koncentrációban történt. A transzgenikus HeLa-alapú setjvonalat a pTRE-d2EGFP (Clontech) és pSV40-Hygro plazmidok kotranszfekciójával és hygromycin szelekcióval állítottuk elô.

Integrálódott transzpozonok izolálása kromoszómális DNS-bôl plazmid "rescue"-val. Zeocin-rezisztens sejtklónok genomikus DNS-ét a Qiagen DNeasy tissue kit segítségével tisztítottuk. A DNS-t (kb. 5 μg) *Nhe*I, *Spe*I and *Xba*I restrikciós enzimekkel emésztettük, melyek kompatibilis végeket eredményeznek, és nem hasítanak a transzpozonon belül. Az emésztett DNS-t 500 μl térfogatban, 1200 egység T4 ligázzal (NEB) ligáltuk 16° C-on 12 órán keresztül, melyet egy kloroformos extrakció és 50 μl 2.5 M kálium acetát (pH 8.0) hozzáadása követett. A ligált DNS-t kicsaptuk, és DH10B *E. coli* elektrokompetens sejtekbe (Gibco BRL) elektroporáltuk.

Transzpozon inszerciós helyek térképezése. A MAR-Wiz szoftver (http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz/) S/MAR régiókat prediktál DNS

szekvencia ill. olyan szerkezeti jellemzôk alapján, mint az AT-gazdagság, hajlíthatóság és topoizomeráz II felismerô helyek jelenléte, amelyek általában együttesen fordulnak elô az S/MAR régiók környezetében. A MAR-Wiz standard paramétereit használtuk.

Strukturális vizsgálatok. A B-DNS csavarodást, A-filicitást, DNS-hajlíthatóságot és fehérje-indukált deformálhatóságot egy három bázispáros csúszó ablak segítségével elemeztük, mely alkalmas arra, hogy az egymás mellett lévô bázisok DNS biofizikai tulajdonságaira gyakorolt hatásait mérje. A transzpozon inszerciós helyeket egy véletlenszerûen kiválasztott DNS adatbázishoz, mint kontroll csoporthoz hasonlítottuk. A MANOVA (multivariate analysis of variance) szoftvert használtuk az inszerciós helyek és a kontroll közötti különbségek szignifikanciájának megállapítására.

DNase I emésztés. A kettôs szálú oligonukleotidokat $\propto$-^{32}P-dATP-vel és Klenow polimerázzal radioaktívan jelöltük, melyet egy DNase I-gyel történô emésztés követett olyan körülmények között, hogy az átlagos molekulánkénti hasítások száma <1 volt. A reakció 90 másodpercig tartott 37°C-on, majd a reakciót leállítottuk 1 térfogat 80% formamide, 0.1% bromophenol blue es 10 mM EDTA hozzáadásával, melyet egy 8% polyacrylamide denaturáló (8 M urea) gélen való szeparálás követett. A megszárított gélt egy phosphorimager screenre exponáltuk, és egy Molecular Dynamics PhosphorImager System segítségével kvantitáltuk.

SAF-kötésen alapuló pull-down assay. Radioaktívan jelölt DNS fragmentumokat inkubáltunk rekombináns, IgG-gyöngyökön immobilizált SAF-A peptiddel. Nem-specifikus kompetitorként fragmentált *E. coli* DNS-t használtunk 1:1000 arányban. A nem kötött DNS-t mosással eltávolítottuk, majd a kötött DNS-t szcintillációs számlálással kvantitáltuk.

Eredmények

A *Sleeping Beauty* transzpozon célhely-kiválasztása

A Sleeping Beauty *transzpozon inszerciója random a humán genomban*

Az SB transzpozon genomikus integrációs mintázatának tanulmányozása érdekében nagy számú inszerciót indukáltunk human HeLa sejtekben. A transzpozíciós assay egy zeocin rezisztencia génnel (*zeo*) ellátott SB transzpozon extrakromoszómális plazmidokból kromoszómákra való transzpozícióján alapul. 138 inszerciós helyet azonosítottunk és térképeztünk humán kromoszómákra számítógépes analízissel (BLAST). Ugyan a transzpozíciós események kromoszómális megoszlása nem volt egyforma, egyértelmû kromoszómális ill. szub-kromoszómális preferenciákat nem lehetett megállapítani. Ez a megfigyelés azt sejteti, hogy bármely kromoszóma szolgálhat transzpozíciós célként. A 138 inszercióból 48 (35%) történt átíródó régiókban. Miután a humán genom kb. egy harmada átíródik, az adatok azt mutatják, hogy a transzkripció sem negatívan, sem pozitívan nem befolyásolja a transzpozon integrálódását. Az eredmények tehát az SB transzpozon random kromoszómális inszercióját támasztják alá.

Sleeping Beauty *egy palindrom AT-ismétlôdést részesít elônyben inszerciójához*

Sleeping Beauty (és az összes többi Tc1/*mariner* családba tartozó transzpozon) TA dinucleotidokba inszertálódik, melyek átlagosan 20 bázispáronként fordulnak elô a gerinces genomokban. A következôkben azt vizsgáltuk, hogy minden TA egyformán elônyös célhely-e az SB számára, vagy esetleg egyéb szekvenciák is befolyásolják a célhely kiválasztását. 71 kromoszómális célhelyet illesztettünk a TA inszerciós ponton egyezô orientációban (a transzpozonhoz képest), és megállapítottuk a konszenzus célhely szekvenciáját. Ez egy nyolc bázispáros, palindrom AT-ismétlôdés: ATA**TA**TAT, amelyben a központi TA az inszerciós hely.

A DNS strukturális tulajdonságai Sleeping Beauty *inszerciós helyeken*

Miután találtunk egy közös DNS szekvenciát, mely preferált célhelyként szolgál, a következôkben azt vizsgáltuk, hogy van-e bármi közös az SB inszerciós helyekben a DNS szerkezeti tulajdonságainak tekintetében. Az itt vizsgált szerkezeti tulajdonságok a GC tartalomra, B-DNS csavarodásra, A-filicitásra, DNS hajlíthatóságra és fehérje-indukált deformálhatóságra terjedtek ki. A vizsgált adatbázis 58 szekvenciát tartalmazott, mindegyik 61 bázispárral a célhelyként szolgáló TA két oldalán, míg a kontroll csoport a humán 21-es kromoszóma random módon kiválasztott DNS szekvenciáiból állt (melyek szintén egy TA-nál lettek illesztve annak érdekében, hogy maga a TA által reprezentált DNS szerkezeti sajátságokat kiszûrhessük). Az eredmények azt mutatták, hogy a DNS hajlíthatóság tekintetében a két mintacsoport szignifikánsan különbözött egymástól (95%-os konfidencia szinten); az eltérô bázispár pozíciók csoportban és az inszerciós helyek közvetlen környezetében térképezôdtek. Egy DNase I emésztésen alapuló assay segítségével megerôsítettük, hogy az SB inszerciós helyek fokozott DNS hajlíthatósággal jellemezhetôk.

Hidrogénkötési mintázatok a transzpozon inszerciós helyein

Valószínûsíthetô, hogy a transzpozáz - más DNS-kötô fehérjékhez hasonlóan - hidrogén-kötéseket létesít DNS szubsztrátjával. Vizsgálatainkban összehasonlítottuk a Tc1/*mariner* transzpozon család inszerciós helyeit és random módon kiválasztott DNS szekvenciákat abban a tekintetben, hogy milyen mértékben képesek hidrogen-kötéseket alkotni a DNS nagy árkában. Mind az SB, mind a Tc1 transzpozonok inszerciós helyei egy szimmetrikus, 10 bázispáros (belértve a TA célszekvenciákat is), palindromikus mintázatot mutattak. Valószínûsíthetô tehát, hogy a fogadó DNS hidrogénkötési potenciálja hozzájárul a transzpozonok inszerciós mintázatának kialakulásához.

Irányított *Sleeping Beauty* transzpozíció humán sejtekben

Transzpozáz fúziók transzpozíciós aktivitása

Az irányított transzpozíció céljára olyan kísérleti stratégiákat követtünk, melyek során a kromoszómális cél DNS-kötô fehérjék 1) transzpozázzal, 2) a transzpozon DNS-t kötô fehérjével, vagy 3) a transzpozázzal interakcióba lépô fehérjével kialakított fúziós fehérjéket alkalmaztunk.

Az elsô stratégia keretében olyan fehérjéket alakítottunk ki, melyekben az SB transzpozáz fuzionáltatva van a tetraciklin represszorhoz (mely specifikusan köti a tetraciklin operátor szekvenciát), vagy a Jazz ill. az E2C CF fehérjékhez. A transzpozáz fúziók aktivitását egy PCR-alapú ún. exciziós (kivágódási) teszttel, ill. egy kromoszómális transzpozon inszerciós assay segítségével vizsgáltuk. Négy tesztelt konstrukció közül csak a Jazz/SB fúzió mutatott detektálható – de a nem fuzionált transzpozázhoz képest jelentôsen alacsonyabb – aktivitást humán HeLa sejtekben. Mindazonáltal, a Jazz/SB fúzió által generált kromoszómális inszerciók között nem tudtunk irányított eseményeket kimutatni, sem az utrophin lókuszban, sem olyan kromoszómális környezetben, amelyben a Jazz 9 bázispáros felismerôhelye elôfordul. Az eredmények azt mutatják tehát, hogy a legtöbb közvetlen fúzió negatív hatással van az SB transzpozáz aktivitására, valamint hogy célzott transzpozícióhoz nagyobb DNS-kötô specifitásra van szükség.

Irányított transzpozíció transzpozon DNS-t kötô fúziós fehérjékkel

Miután a közvetlen transzpozáz módosításoknak negatív hatásuk volt a transzpozícióra, a következôkben egy olyan stratégiát teszteltünk, mely a transzpozon DNS módosításán alapul. Kísérleteinket olyan kromoszómális régiókba való irányított transzpozícióval kezdtük, melyek gyakran elôfordulnak a genomban, melyek bázis-összetétele AT-gazdag, és melyeknek ismert jól jellemzett, kölcsönhtásba lépô fehérje-determinánsa. A scaffold/matrix attachment régiók (S/MAR), melyek a sejtmagi mátrixhoz

való kapcsolódásával önálló kromoszómális „loop“-okba szervezi a genomot, megfelelnek ezeknek a szempontoknak.

A következôkben egy olyan fehérje fúziót alakítottunk ki, melyben a SAF-box (mely egy evolúciósan megôrzôdött S/MAR-kötô fehérje) az *E. coli* LexA fehérje C-terminusára van fuzionálva. A LexA feladata, hogy a transzpozon DNS-be ültetett LexA operátor szekvenciához kötôdjön. Hipotézisünk az volt, hogy a LexA-SAF fúziós fehérje kromoszómális S/MAR régiókhoz valamint a transzpozon vektorhoz való szimultán kötôdése révén a transzpozíciós komplexet a célhelyek közvetlen közelébe tudjuk irányítani. A transzfektált HeLa sejteket „pool“-oztuk, az integrációs helyeket klónoztuk és azokat egy MAR-Wiz nevû szoftver segítségével analizáltuk. 56 mintát hasonlítottunk egy azonos számú kontroll csoporthoz a prediktált S/MAR regiókhoz való fizikális közelség tekintetében. Egy statisztikusan szignifikáns (p=0,024) különbséget mértünk a két adatcsoport között; nevezetesen azon inszerciók számában, melyek a legközelebb térképezôdtek egy S/MAR-hoz. Az ily módon izolált potenciális S/MAR regiókat egy *in vitro* SAF-box kötési teszt segítségével validáltuk, ami arra enged következtetni, hogy ezek az irányított SB inszerciók valóban a SAF-box DNS-kötô aktivitásának eredményei.

A következô kísérletek során a humán genom egy egyedi lókuszába próbáltuk irányítani a transzpozíciós eseményeket. Ecélból a TetR-operátor rendszerre koncentráltunk. A SAF-box kötôdésével ellentétben a TetR kötôdése az operátorhoz magas szintû szekvencia-specifitást mutat. Elôállítottunk egy olyan HeLa-alapú transzgénikus sejtvonalat, mely tartalmazta a TRE régiót (a tetraciklin operátor 7-szeres ismétlôdése), mint modell kromoszómális célhelyet. Az irányító fúziós fehérje a TetR-ból és a LexA fehérjébôl állt, mindkét fúziós partner kötési aktivitását *in vitro* bizonyítottuk.

A transzgénikus HeLa sejteket transzfektáltuk, a kolóniákat „pool“-oztuk, és az irányított transzpozíciós eseményeket PCR segítségével

teszteltünk genomikus DNS preparátumból. Az integrálódott transzpozont mindkét lehetséges orientációban detektáltuk a TRE-EGFP lókuszban, de csak a LexA kötôhelyet tartalmazó vektorral, ami arra utal, hogy a LexA fehérje és a transzpozon DNS-ben reprezentált kötôhelye közötti kölcsönhatás elengedhetetlen feltétele az irányított transzpozíciós eseményeknek. A PCR termékek szekvenálása bizonyította, hogy az SB transzpozon két lehetséges orientációban integrálódott a TRE régiótól 44 és 48 bázispár távolságra lévô TA szekvenciákba. Megállapíthatjuk tehát, hogy stratégiánk, mely az irányító fúziós fehérjék azon képességén alapul, hogy a cél DNS-t és a transzpozont is képesek kötni, sikeresen juttatott SB transzpozon inszerciókat a humán genom egy specifikus lókuszába.

Irányított transzpozíció transzpozáz fehérjét kötô fúziós fehérjékkel

Számos, a természetben elôforduló transzpozon alkalmaz fehérje-fehérje kölcsönhatásokon alapuló mechanizmusokat specifikus célszekvenciákba történô irányított transzpozícióra. Ahhoz, hogy egy ehhez hasonló stretégiát adaptáljunk az SB transzpozonra, elôsorban olyan fehérjéket kell azonosítanunk, melyek kölcsönhatásba lépnek a transzpozázzal. Egy korábbi munkánk során azonosítottunk egy, a transzpozáz N-terminusán (az N-terminális 57 aminosavban kódolva) elhelyezkedô domaint, mely a transzpozáz molekulák közötti kölcsönhatásokért felelôs. Ennek megfelelôen elképzelésünk az volt, hogy az N-57-et tartalmazó fúziós fehérjék megôrzik a cél DNS-t és a transzpozázt kötô képességüket anélkül, hogy ez a kölcsönhatás negatívan befolyásolná a transzpozíció folyamatát.

A már fent leírt kísérletes stratégiát alkalmaztuk, azzal a különbséggel, hogy az irányító fúziós fehérje a TetR-ból és az N-57-bôl állt. Az integrálódott transzpozont mindkét lehetséges orientációban detektáltuk a TRE-EGFP lókuszban, de csak az N-57-et tartalmazó fúziós fehérjével, ami arra utal, hogy az N-57 és a transzpozáz közötti kölcsönhatás elengedhetetlen

feltétele az irányított transzpozíciós eseményeknek. Továbbá, irányított transzpozíciót csak doxyciklin (egy antibiotikum, ami gátolja a TRE és a TetR közötti kölcsönhatást) hiányában tudtunk detektálni, ami jelzi, hogy a TRE önmagában nem preferált inszerciós hely. Mind az N-57, mind a TRE és a TetR közötti kölcsönhatás (tehát egy aktív irányító mechanizmus komponensei) szükségesek az irányított transzpozícióhoz. Összességében 12 inszerciós helyet klónoztunk ki a TRE-EGFP cél lókuszból (ezek 6 független transzfekcióból származtak), ezek küzül 3 helyen több, egymástól független transzpozíciós esemény is történt. Az irányított transzpozíciós események gyakoriságának becslésére a lókusz-specifikus PCR tesztet egyedi klónokon is elvégeztük. Ez a gyakoriság >10%, tehát átlagosan kb. minden tizedik transzgénikus sejtklón tartalmaz legalább egy irányított transzpozon inszerciót. Megállapíthatjuk tehát, hogy az N-57 és a transzpozáz közötti fehérje-fehérje kölcsönhatáson alapuló stratégia sikeresen alkalmazható az SB transzpozon a humán genom egy specifikus lókuszába történô inszerciójára.

Új tudományos eredmények

1. Megállapítottuk, hogy a kísérletesen indukált *Sleeping Beauty* transzpozon inszerciók kromoszómális eloszlása a humán genomban random, az inszerciós események bármely kromoszómán megtörténhetnek, nincsenek kiemelten preferált célhelyek (ún. „hotspot“-ok), és a kódoló ill. nem kódoló DNS egyformán alkalmas a transzpozon inszercióra.
2. Megállapítottuk, hogy lokális szinten az SB transzpozon egyértelmû specifitást mutat az inszerciós helyek tekintetében, melyet a fogadó DNS primér szekvenciája és strukturális jellemzôi befolyásolnak. Az SB transzpozon preferált inszerciós helyei egy palindrom szekvenciájú AT-ismétlôdéssel, fokozott hajlíthatósággal és a DNS nagy árkának szimmetrikus mintázatú hidrogénkötési potenciáljával jellemezhetôk.
3. Demonstráltuk, hogy az SB transzpozont irányított transzpozícióval a humán genom bizonyos meghatározott pontjaira lehet juttatni. Kísérleteink elsôként a világon nyújtanak bizonyítékot arra, hogy egy amúgy random módon integrálódó transzpozont kromoszómák kiválasztott lókuszaiba lehet irányítani.
4. Kidolgoztunk egy olyan kísérleti stratégiát, mely irányító fúziós fehérjék azon képességén alapul, hogy kölcsönhatásba lépnek a transzpozon DNS-sel, és ezáltal a humán genom egy specifikus DNS szekvenciájának közelébe irányítják a transzpozon integrációját.
5. Az SB transzpozáz N-terminális domainje sikeresen irányít transzpozon inszerciókat a humán genom egy adott lókuszába, ennek hatékonysága eléri a 10^7-szeres dúsulást a random transzpozícióhoz képest egy adott TA helyre vetítve.

Következtetések és javaslatok

A DNS Sleeping Beauty *célhely-szelekciót befolyásoló fizikai jellemzôi*

Az integrálódó vektor rendszerek célhely-szelekcióját számos tényezô befolyásolja. Ezek közé tartozik a célhely kromatin komponensek által befolyásolt hozzáférhetôsége, a DNS primér szekvenciája és fizikai szerkezete, olyan endogén fehérjék expressziója, amelyek egy adott DNS szakaszon belül kötôdnek, valamint a rekombináz fehérje saját DNS-felismerési és katalitikus jellemzôi.

Kísérleteinkben *Sleeping Beauty* inszerciós helyeket jellemeztünk mind genomi szinten (az inszerciós helyek kromoszómális térképezésével), mind lokálisan (a fogadó DNS szekvenciájának és strukturális jellemzôinek vizsgálatával). Megállapítottuk, hogy a kísérletesen indukált *Sleeping Beauty* transzpozon inszerciók kromoszómális eloszlása a humán genomban random, az inszerciós események bármely kromoszómán megtörténhetnek, nincsenek kiemelten preferált célhelyek (ún. „hotspot"-ok), és a kódoló ill. nem kódoló DNS egyformán alkalmas a transzpozon inszercióra.

Vírus-alapú vektorokkal (retrovírus-, lentivírus- és AAV-alapú vektorok) összehasonlításban elmondható, hogy az SB transzpozon génekbe történô integrálódásra való preferenciája sokkal kisebb (az SB inszerciók 35%-a történik RefSeq génekben, míg ez az arány ASV-re 53%, MLV-re 51%, HIV1-re 83% és AAV-re 72%), és ennek megfelelôen az SB technológia a jelenleg alkalmazott virális megközelítéseknél biztonságosabb génbeviteli módszer génterápiás eljárásokra.

A DNS két tulajdonsága definiálja az SB transzpozon által preferált integrációs helyeket, ezek a DNS hajlíthatósága és a cél DNS nagy árkának szimmetrikus hidrogénkötési mintázata. A hajlítható struktúra fontos lehet ahhoz, hogy a DNS-hez kötôdô transzpozáz végigvigye a száltranszfert (a

DNS mindkét szálát meg kell törni, és a transzpozon 3‘ végeit egy transzészterifikációs folyamat keretében a cél DNS-be integrálni). Az inszerciós helyek 10 bázispáros, palindrom mintázatú hidrogénkötési potenciálja azt sugallja, hogy a cél DNS-t a transzpozáz dimer vagy multimer formája köti. Ezt támasztja alá egy korábbi megfigyelésünk, miszerint a transzpozáz tetramert alkot oldatban. A hidrogénkötési mintázat továbbá jelzi, hogy a transzpozáz a cél DNS nagy árkával lép kölcsönhatásba.

Mindent összevetve elmondhatjuk, hogy a transzpozonok cél DNS-sel való kölcsönhatása, valamint az inszerciós helyek kiválasztása jóval specifikusabb folyamat, mint azt korábban feltételeztük. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a fogadó DNS részérôl a meghatározó tényezô a strukturális sajátosságok, nem pedig a primér szekvencia. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a DNS egyes fizikai tulajdonságainak kombinációja egy térbeli optimumot szolgáltat a transzpozáz által katalizált folyamatokhoz.

Lépések az irányított Sleeping Beauty *transzpozíció felé*

Munkánkban bemutattuk, hogy az irányított transzpozon integráció lehetséges humán sejtekben. Ez a tény önmagában is figyelemreméltó, hiszen az SB transzpozon kromoszómális inszerciója amúgy teljesen random.

Irányított SB transzpozícióra három különbözô molekuláris stratégiát vizsgáltunk, melyek egy heterológ DNS-kötô fehérje 1) transzpozázhoz, 2) egy transzpozon DNS-t kötô fehérjéhez, 3) egy transzpozázzal kölcsönhatásba lépô fehérjével való fúzióján alapulnak. A közvetlen transzpozáz fúziók közül csak egy (a Jazz/SB fúzió) mutatott transzpozíciós aktivitást, de irányított transzpozíciós eseményeket ezzel a fehérjével nem kaptunk. A Jazz 9 bázispáros DNS felismerési specifitása minden bizonnyal nem elegendô a transzpozíciós komplex irányításához. A jövô útja a nagy specifitással és egyben nagy affinitással rendelkezô mesterséges CF fehérjék izolálása és a fúziós fehérjék domainjeit összekötô spacer régiók tervezése és szelekciója.

A második, sikeresebb stratégia olyan fúziós fehérjéken alapult, melyek képesek két olyan DNS molekulát kötni és egymáshoz közel hozni, melyekben a fúziós partnerek kötô helyei reprezentálva vannak. Ezt olyan módon teszteltük, hogy a transzpozonba építettünk egy LexA operátort, és kialakítottunk egy LexA fehérjébôl és egy SAF-box-ból álló fúziós fehérjét. A SAF-box specifikusan köti a scaffold-matrix attachment régiókat (S/MAR). A fúziós fehérje jelenlétében megnövekedett az S/MAR régiók 1 kilobázisos környezetében bekövetkezô inszerciók elôfordulási gyakorisága. Nagy DNS szekvencia-specifitással rendelkezô fehérjékkel való irányított transzpozíció lehetôségét a tetraciklin represszort (TetR) és a LexA-t tartalmazó fúzióval vizsgáltuk egy TRE (tetracycline response element) lókuszt hordozó transzgénikus HeLa sejtvonalban. Mindkét lehetséges orientációban detektáltunk irányított SB inszerciókat 44 ill. 48 bázispár távolságra a célzott TRE régiótól. Irányított transzpozíciós eseményeket csak a LexA operátort tartalmazó transzpozon vektorral kaptunk, ami azt jelzi, hogy az irányító fehérje és a transzpozon DNS közötti kölcsönhatás elengedhetelen feltétele az irányított SB inszercióknak. Valószínûsíthetô tehát, hogy ezek az irányított transzpozíciós események valóban az irányító fúziós fehérje azon képességén alapulnak, hogy egyidejûleg képes kötni mind a transzpozon- mind a befogadó cél DNS-t. Megállapíthatjuk tehát, hogy ez a stratégia ígéretes, mivel nincs negatív hatással a transzpozíció folyamatára, de a módszer sikere azon múlik, hogy az irányító fúziós fehérje megfelelôen lépjen kölcsönhatásba a módosított transzpozonnal.

Egy harmadik stratégiát is értékeltünk, ez egy olyan irányító fúziós fehérjén alapult, mely egy specifikus DNS-kötô domainen kívül tartalmazta az SB transzpozáz fehérje-fehérje kölcsönhatásért felelôs N-terminális domainjét. Hatékony irányított transzpozíciót mutattunk ki e stratégia alkalmazásával: a transzpozíción átesett sejtek 10%-a tartalmazott legalább egy irányított transzpozíciós eseményt a célzott kromoszómális régióban. Miután a humán genom bármely TA szekvenciájába történô transzpozíció

elméleti gyakorisága random inszerció esetén kb. $1/10^8$, az általunk kidolgozott stratégia e gyakoriság kb. 10^7-szeres dúsulásának felel meg egy adott lókuszra vetítve. E módszer lényeges elônye a közvetlen transzpozáz fúziókkal szemben az, hogy a transzpozáz fehérjét nem szükséges módosítani, és ennélfogva a transzpozáz módosításának negatív hatásai kiküszöbölhetôek.

Az irányított transzpozíciós események molekuláris vizsgálata a következô következtetéseket engedi levonni. Elôször is, bár detektáltunk egy preferált integrációs „hotspot"-ot 44 bázispár távolságra a TRE-tôl, az irányított transzpozíciós események egy 2,6 kilobázisos szakaszon belül, szétszórva helyezkedtek el a TRE környezetében. Megfigyeléseink az irányított transzpozíció egy olyan modelljét támasztják alá, melyben a transzpozíciós komplexet fehérje-fehérje kölcsönhatások irányítják egy adott kromoszómális régióba, de azt, hogy ezen a régión belül pontosan hol fog az inszerciós esemény bekövetkezni, a fogadó DNS és a transzpozon közötti kapcsolatok biokémiai és biofizikai szabályai határozzák meg. Másodszor, kísérleteinkbôl egyértelmûen kiderül, hogy az irányított transzpozíciós események mellett nagy számban fordulnak elô nem irányított események is. E tekintetben fontos hangsúlyozni, hogy a jelen kísérletekben használt SB transzpozáz cél DNS-s kötô aktivitása teljes mértékben intakt volt. Ez azt jelenti, hogy mihelyt bekerül a sejtmagba, a transzpozáz potenciális TA célhelyek ezreivel „találja magát szemközt", és az ezekbe a TA helyekbe történô inszerciót nem akadályozza semmi. Vagyis a transzpozáz nem-specifikus DNS-kötési aktivitása kompetál azzal a specifikus DNS-kötési aktivitással, mely szükséges a célzott DNS szekvenciába történô inszercióhoz, és ezáltal csökkenti az irányított transzpozíciós események gyakoriságát.

Helyspecifikus transzgén inszerciós technológiáknak a molekuláris genetika legalább három területén van gyakorlati jelentôségük. Elôször is, irányított

transzpozícióval olyan genomok helyspecifikus manipulációja elôtt nyílhat meg az út, amelyekben homológ rekombináción alapuló technikák még nem lettek kifejlesztve. Másodszor, helyspecifikus transzgén inszercióval elkerülhetôekké válhatnak a transzgénikus beavatkozások során oly gyakran megfigyelt pozíció hatások és transzgén csendesítési jelenségek. Végül, de nem utolsósorban, az a lehetôség, hogy a genom biztonságos célhelyeire juttassunk transzgén konstrukciókat, potenciálisan csökkentheti a genotoxikus hatásokat, és ezáltal nagymértékben hozzájárulhat biztonságos vektorrendszerek génterápiás alkalmazásához. A kihívás most az, hogy fiziológiásan releváns célhelyeket azonosítsunk a humán genomban, és hogy olyan fehérjéket állítsunk elô, amelyek ezekhez a célhelyekhez kötôdnek, és amelyek ezekbe a célhelyekbe nagy hatékonysággal képesek transzpozíciós eseményeket irányítani.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Szakcikkek lektorált folyóiratokban

Vigdal, T., Kaufman, C., Izsvák, Z., Voytas, D. and **Ivics, Z.** (2002). Common physical properties of DNA affecting target site selection of *Sleeping Beauty* and other Tc1/*mariner* transposable elements. *J. Mol. Biol*. 323:441452.

Ivics, Z. and Izsvák, Z. (2006). Transposons for gene therapy! *Curr. Gene Ther.* 6:593-607.

Ivics, Z., Katzer, A., Stüwe, E.E., Fiedler, D., Knespel, S. and Izsvák, Z. (2007). Targeted *Sleeping Beauty* transposition in human cells. *Mol. Ther.* 15:1137–1144.

Voigt, K., Izsvák, Z. and **Ivics, Z.** (2008). Targeted gene insertion for molecular medicine. *J. Mol. Med.* (Epub ahead of print)

Konferencia kiadványok

Ivics, Z., Izsvák, Z., Kaufman, C.D., Zayed, H., Walisko, O. and Miskey, C. (2003). *Sleeping Beauty*: Evolution, Regulation and Genetic Applications in Vertebrates. Keystone symposium on Transposition, Santa Fe, USA

Ivics, Z. (2005). Host Cell - Transposon Crosstalks in *Sleeping Beauty* Transposition and Transposon Targeting. Annual conference of the Beckman Center for Transposon Research, Minneapolis, USA

Ivics, Z. (2005). *Sleeping Beauty*: Evolution, Mechanism and Application of DNA Transposable Elements for Gene Transfer in Vertebrates. Annual meeting of the German Society of Gene Therapy, Wurzburg, Germany

Ivics, Z., Katzer, A., Stüwe, E.E., Fiedler, D. and Izsvák, Z. (2005). Targeted DNA transposition in human cells. Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Prague, Chech Republic

Ivics, Z., Walisko, O., Schorn, A., Katzer, A. and Izsvák, Z. (2006). *Sleeping Beauty* transposon vectors: Transcriptional shielding with insulators and targeted transposition in human cells. Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Athens, Greece, 2006

Ivics, Z., Walisko, O., Schorn, A., Katzer, A. and Izsvák, Z. (2006). *Sleeping Beauty* transposon vectors: Transcriptional shielding with insulators and targeted transposition in human cells. Annual meeting of the British Society of Gene Therapy, London, UK

Ivics, Z., Katzer, A., Stüwe, E.E., Fiedler, D. and Izsvák, Z. (2007) Targeted DNA transposition in human cells. FASEB Conference on Mammalian Mobile DNA, Tucson, USA

Ivics, Z., Katzer, A., Stüwe, E.E., Fiedler, D. and Izsvák, Z. (2007). Targeted DNA transposition in human cells. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred, Hungary

Ivics, Z., Walisko, O., Schorn, A., Mátés, L. and Izsvák, Z. (2008). Transposable elements as nonviral vector systems for stable gene delivery. 2nd Conference on Drug Delivery and Translational Research, New York, USA